

# Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats

著者	中島 恭二
発行年	2000-06-07
その他の言語のタイトル	ラット腸管神経系における末梢型コリン合成酵素の免疫組織学的検討 ラット チョウカン シンケイケイ ニ オケル マッショウガタ コリン ゴウセイ コウソ ノ メンエキ ソシキガクテキ ケントウ
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10422/2692">http://hdl.handle.net/10422/2692</a>

氏名・(本籍)	中 島 恭 二 (滋賀県)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 (論) 第267号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成12年6月7日
学位論文題目	Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats (ラット腸管神経系における末梢型コリン合成酵素の免疫組織学的検討)
審査委員	主査 教授 工 藤 基 副査 教授 木 村 宏 副査 教授 遠 山 育 夫

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

コリン神経系の形態学的研究は、アセチルコリン (ACh) の合成酵素であるコリン合成酵素 (ChAT) の免疫組織化学法により検討されてきた。しかし腸管をはじめとした末梢組織のコリン神経は、従来の ChAT の免疫組織化学法では十分に解明できなかった。最近木村、遠山教授らはラットの翼口蓋神経節より従来の ChAT から選択的スプライシングにより生じる末梢型 ChAT (pChAT) を発見され、その抗体による免疫染色が可能となった。本研究はこの pChAT 抗体を用いて、従来困難であった、腸管コリン神経を形態学的に解析することを目的とした。

### 【方 法】

対象は Wistar 系雄性ラットの腸管を用いた。4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で動物をかん流固定し、食道から直腸までの腸管を摘出、20 $\mu$ の凍結切片を作成した。免疫染色は教室で作成されたウサギポリクローナル抗 pChAT 抗体による免疫組織化学法を用いた。

従来よりコリン神経のマーカーとされてきた ACh 分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の組織化学法を pChAT の免疫染色と合わせて行い、両者の分布を比較した。

近年、腸管運動の抑制系の神経として注目されている NO 神経のマーカーとして、NADPH-diaphorase の組織化学を用い、pChAT の免疫染色と二重染色し検討した。

染色の種差を検討するため、従来より腸管神経の研究に多用されている guinea pig の pChAT 免疫染色、NADPH-diaphorase 組織化学をラットと同様の方法で行った。

分子生物学的に、ラット脳 (線条体)、翼口蓋神経節、十二指腸より RNA を抽出し cDNA を作成、PCR 法を用いて増幅の後、ChAT の DNA と比較検討した。

### 【結 果】

ラット腸管では食道から直腸まであらゆる部位で pChAT 陽性神経を認めた。陽性構造は腸管の部位により分布の差異はあるものの、粘膜下神経節や筋層間神経節の神経細胞、神経節間の神経束、粘膜内や血管周囲の神経線維、平滑筋層の神経線維などに広く認められた。全体の神経細胞に対する pChAT 陽性神経細胞の頻度は粘膜下神経節の約80%、筋層間神経節の約60%を占めていた。

pChAT と AChE の二重染色では、pChAT 陽性の神経細胞はほとんど全て AChE 活性を有していたが、一部には AChE 活性のみを示す神経細胞も見られた。AChE 陽性細胞中に占める pChAT 陽性神経細胞の割合は、筋層間神経節より粘膜下神経節のほうが高かった。また筋層間神経節での頻度を腸管の部位別に検討すると、大腸側の筋層間神経節の方が pChAT 陽性細胞の頻度が低い傾向にあった。

pChAT と NADPH-diaphorase 二重染色の検討では、ラットで両者の分布は共存しなかった。

Guinea pig を用いた検討では、ラットと同様に消化管の広い範囲で陽性神経細胞、神経線維が認められた。興味深いことにラットと異なり、筋層間神経節では pChAT 神経細胞のうち、十二指

腸では3.6%、結腸では21.3%に NADPH-diaphorase の共存がみられた。

従来の ChAT 抗体を用いた免疫染色では、ラット腸管神経は染色されなかった。Guinea pig 腸管では、神経細胞に陽性反応が見られたが、染色が弱く、形態学的な評価は困難であった。

PCR による分析では、翼口蓋神経節と十二指腸において従来の ChAT をコードする cDNA (754bp) の他に、pChAT に一致する小さいサイズ (124bp) の cDNA が検出された。

#### 【考 察】

pChAT 抗体による陽性神経は、従来形態学的あるいは生理学的に示唆されている腸管コリン神経系の分布に一致して見られた。粘膜の知覚および分泌神経、平滑筋への運動ニューロン、粘膜下や筋層間神経節の知覚ニューロン、介在線維、血管運動神経などが形態的にも類推された。本抗体では神経細胞の突起が非常に鮮明に描出され、形態解析に有用であった。

pChAT と AChE の二重染色より、中枢神経同様に腸管でも AChE はコリン神経の特異的マーカーとは考えられなかった。両者の共存の比率が腸管部位により異なることの意義は今後の興味ある課題である。pChAT と NADPH-diaphorase の共存はラットでは見られず、guinea pig では認められた。pChAT 陽性神経の分布は両動物で大きな差はなかった。今後形態研究に種差による検討も考慮する必要がある。これら二重染色を用いることにより、腸管においてコリン性、非コリン非アドレナリン性神経のより詳細な解析が可能と思われた。

PCR の検討より、pChAT の mRNA が腸管で得られ、pChAT 蛋白が腸管神経組織で発現していることが判明した。

#### 【結 論】

新しく作成された pChAT 抗体を用いてラット腸管を免疫組織学的に検討した。腸管に広く陽性神経、陽性神経線維が認められた。pChAT 抗体は腸管コリン神経を認識していると考えられた。pChAT 抗体を用いた免疫染色は今後腸管コリン神経系の形態学的解析に当たり、非常に有用な手法と考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、新しく同定された末梢型アセチルコリン合成酵素 (pChA ; コリンアセチル基転移酵素) に対する抗体を用い、今まで組織化学的な検出が困難であった腸管のアセチルコリン神経系を免疫組織化学的に検索したものである。

ラットおよびモルモットの腸管壁神経叢において、pChAT 抗体により全腸管にわたり神経細胞、神経線維が明瞭に染色された。アセチルコリンエステラーゼ (AChE) との二重染色による解析では、全ての pChAT 陽性神経細胞は AChE 活性を含有していたが、AChE 活性のみを有する細胞もみられた。ラットでは pChAT 陽性神経と NO 神経は共存しなかったが、モルモットでは一部共存が見られ、種差が明らかになった。

本研究はこれまで不明であった腸管コリン神経系の形態をはじめ明瞭に証明したものであり、従って、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年5月15日実施の論文内容とそれに関する試問を受け、合格と認められたものである。